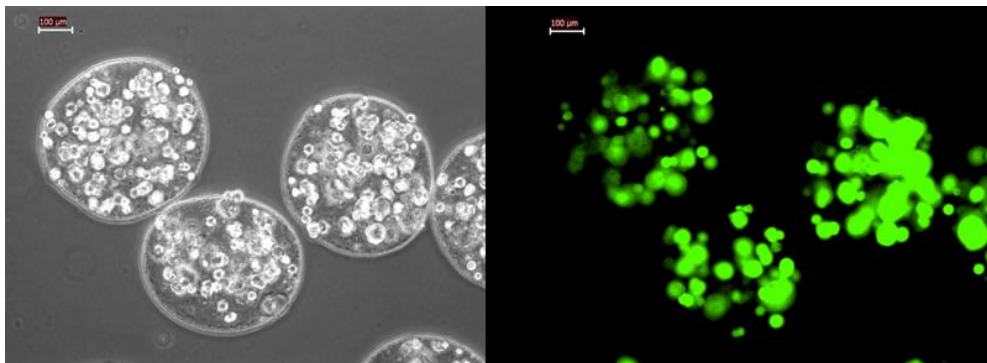
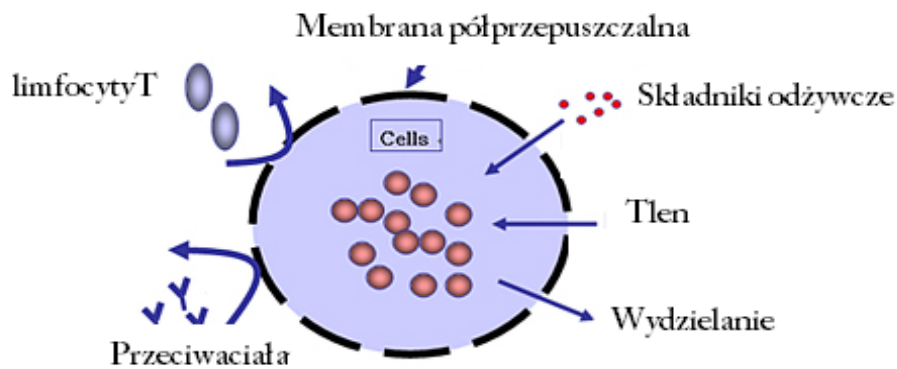


Enkapsulacja

Wstęp teoretyczny:

Enkapsulacja- immobilizacja komórek w materiale biopolimerowym posiadającym cechy półprzepuszczalnej membrany, która z jednej strony pozwala na swobodną dyfuzję metabolitów do wnętrza kapsułki oraz produktów metabolizmu na zewnątrz kapsułki, a z drugiej strony zapewnia immunoizolację- blokuje dostęp białek układu odpornościowego do enkapsulowanych komórek . Jest to obiecująca metoda inżynierii tkankowej ze względu na brak konieczności stosowania po przeszczepie leków immunosupresyjnych. Ponadto środowisko wewnątrz kapsułki doskonale naśladuje trójwymiarową macierz zewnątrzkomórkową oraz umożliwia przestrzenny kontakt komórka- komórka.

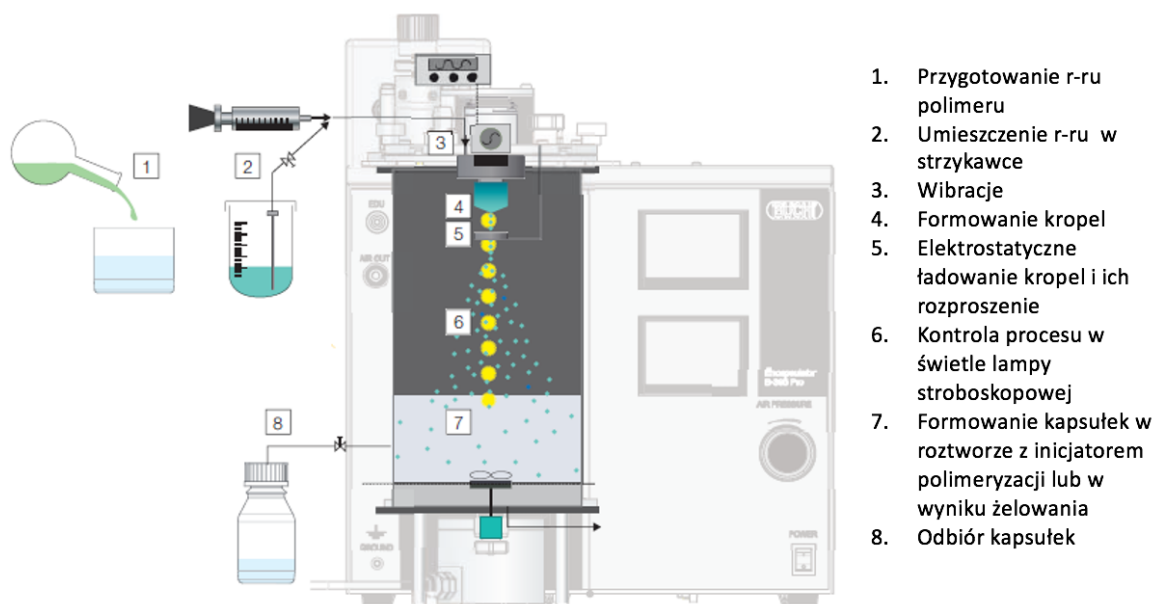


Mikrosfery wytwarzane są przy użyciu enkapsulatora, w którym laminarny przepływ roztworu alginianu przez dyszę o danym rozmiarze zakłócany jest wibracjami, co przy optymalnej częstotliwości drgań opisanej przez Webera (Równanie 1) prowadzi do podziału strumienia na krople, którym następnie nadawany jest za pomocą elektrody jednoimienny ładunek elektrostatyczny, co zapobiega łączeniu się kropeł (Rys. 1). Krople roztworu

alginianu wpadają następnie do roztworu polimeryzującego (roztworu chlorku wapnia), gdzie następuje ich utwardzanie i utrwalanie. Aparatura umożliwia produkcję mikrosfer o rozmiarach od 0,15 mm do 2 mm, także w warunkach sterylnych. Proces charakteryzuje duża produktywność (do 6000 mikrosfer na sekundę) i powtarzalność (w optymalnych warunkach odchylenie standardowe od średnic produkowanych mikrosfer to ok. 5%), gdyż możliwa jest kontrola wszystkich parametrów procesu (natężenie przepływu roztworu alginianu, rozmiar dyszy, częstotliwość drgań, napięcie elektrody).

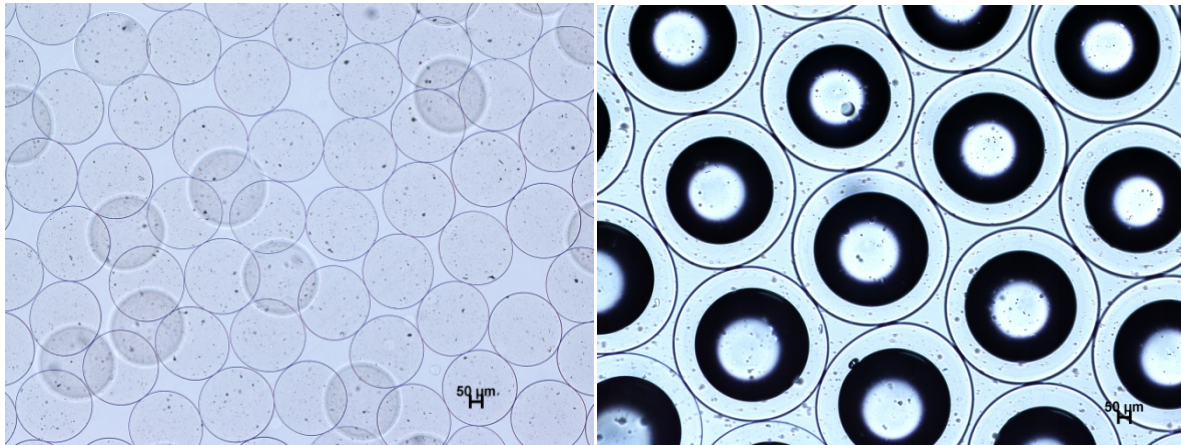
$$\lambda_{opt} = \pi\sqrt{2}D \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} \quad (1)$$

gdzie: D- średnica dyszy [m], η - lepkość dynamiczna [Pa s], ρ - gęstość [kg/m³], σ - napięcie powierzchniowe [N/m].



Rysunek 1. Schemat aparatury do enkapsulacji.

Przy użyciu dyszy koncentrycznej możliwa jest również produkcja kapsułek typu core-shell o ściśle określonych rozmiarach (Rys. 2).



Rysunek 2. Zdjęcia przedstawiające przykłady wytwarzanych mikrosfer (z lewej) o średnicy $324,08 \pm 3,85 \mu\text{m}$ oraz kapsulek (z prawej) o średnicy wewnętrznej $462,99 \pm 12,95 \mu\text{m}$ oraz średnicy zewnętrznej $649,78 \pm 11,16 \mu\text{m}$.

Wykonanie ćwiczenia:

Przygotowanie komórek MG63

Materiały:

- PBS Phosphate Buffered Saline bezwapniowy
- 0,25% Trypsyna-EDTA
- pożywka hodowlana (DMEM, 10% FBS, 1% L-glutaminy, 1% Pen-Strep)
- sterylny 1,5% roztwór alginianu sodu w PBS pH=7,4, ok. 20 ml
- sterylna strzykawka 50 ml z luer-lock

Sprzęt:

- pipety serologiczne
- łaźnia wodna (37°C)
- 15 ml i 50 ml falkony
- odwrócony mikroskop optyczny
- zlewka
- urządzenie do liczenia komórek Scepter/hemocytometr

1. Ogrzać odczynniki w łaźni wodnej.
2. Skontrolować stan komórek pod mikroskopem.
3. Przenieść butelki z łaźni wodnej pod komorę laminarną (spryskać 70% etanolem).
4. Umieścić butelkę z komórkami pod komorą laminarną.
5. Usunąć pożywkę hodowlaną za pomocą pipety serologicznej.

6. Przemyć komórki 10 ml PBS (unikając lania płynu bezpośrednio na powierzchnię komórek).
7. Usunąć PBS, dodać 2 ml trypsyny bezpośrednio na komórki.
8. Inkubować komórki z trypsyną 4 min w inkubatorze.
9. Skontrolować wygląd komórek pod mikroskopem.
10. Jeśli ok. 90% komórek jest okrągła i pływa w pożywce dodać 8 ml pożywki w celu dezaktywacji trypsyny.
11. Przepuścić zawiesinę komórek 10 razy przez koniec pipety dociskając go do rogu butelki.
12. Przenieść zawiesinę komórek do 15 ml falkonu.
13. Wirować komórki przez 5 min przy 200g.
14. Osad komórek zawiesić w 2 ml pożywki, pobrać próbkę do komory hemocytometru, policzyć komórki.
15. Po zwirowaniu komórek zawiesić je w sterylnym roztworze alginianu w ilości 10^6 /ml.
16. Przenieść zawiesinę do sterylnej 50 ml strzykawki z luer-lockiem

Enkapsulacja

Materiały:

- roztwór polimeryzujący (100mM CaCl_2), 1L
- roztwór płuczący (0,9% NaCl+ 10 mM CaCl_2), 1L

Sprzęt:

- lejek
- cylinder 100 ml
- enkapsulator

17. Umieścić pożywkę w łaźni wodnej o temp. 37°C .
18. Umieścić komorę do pracy sterylnej enkapsulatora pod komorą laminarną.
19. Podłączyć strzykawkę z zawiesiną komórek w alginianie do jednostki produkującej mikrosfery.
20. Wlać przy użyciu lejka roztwór polimeryzujący (ok. 400 ml) do komory sterylnej enkapsulatora przez otwór z filtrem płynów (zdjąć uprzednio filtr).
21. Podłączyć komorę do pracy sterylnej do enkapsulatora.
22. Ustawić parametry: **F= 400 Hz, f=4,5 ml/min, U= 1600 V (w razie konieczności zmienić), A=5**
23. Zbierać mikrosfery do by-passu przez kilka sekund do momentu stabilizacji warunków.
24. Odsunąć by-pass, produkować mikrosfery przez kilka minut.

25. Powrócić na by-pass, wyłączyć przepływ i drgania.
26. Mieszać mikrosfery przez ok. 5 min w celu utwardzenia.
27. Pod komorą laminarną złąć r-r polimeryzujący (nie do końca, mikrosfery muszą być nim delikatnie pokryte).
28. Dodać r-r płuczający (ok. 300 ml) i mieszać kilka minut.
29. Złąć r-r płuczający i dodać jego kolejną porcję.
30. Złąć część r-ru płuczającego, resztę przenieść do butelki podłączonej do komory.
31. Odłączyć butelkę od komory, poczekać aż wszystkie mikrosfery zsedymetują.
32. Złąć część roztworu płuczającego znad mikrosfer, przenieść zawiesinę mikrosfer do sterylnego cylindra i sprawdzić objętość mikrosfer (poczekać aż zsedymetują).
33. (Opcjonalnie) Złąć r-r płuczający, zawiesić mikrosfery w ogrzanej pożywce w ilości 1ml mikrosfer/3 ml pożywki.
34. Przenieść zawiesinę mikrosfer na szalki Petriego o średnicy 5 cm w ilości 4 ml zawiesiny/szalkę.
35. Skontrolować obecność komórek i jakość mikrosfer pod mikroskopem optycznym, wykonać zdjęcia mikrosfer (3 zdjęcia/wariant).
36. Powtórzyć proces wytwarzania mikrosfer dla kolejnych wartości częstotliwości drgań: **800, 1000, 1600, 2200 Hz**. W razie konieczności dobrać optymalną wartość napięcia.
37. Umyć i wysterylizować sprzęt.

Sprawozdanie:

1. Obliczyć optymalną długość fali drgań, pozwalającą na produkcję jednorodnych mikrosfer dla dyszy o średnicy 120 um i roztworu alginianu sodu o stężeniu 2%.
2. Zamieścić obliczenia konieczne do uzyskania odpowiedniego rozcieńczenia zawiesiny komórek w roztworze alginianu.
3. Zmierzyć średnice uzyskanych mikrosfer dla wszystkich analizowanych wariantów za pomocą programu ImageJ. Wyznaczyć zależność częstości drgań dyszy od średniej średnicy otrzymanych mikrosfer. Jaki zakres częstości drgań jest optymalny dla danych warunków procesowych i dlaczego?

Zagadnienia do wejściówki:

- Treść instrukcji do ćwiczeń
- Publikacja Hasan Uludag , Paul De Vos , Patrick A. Tresco, Technology of mammalian cell encapsulation, Advanced Drug Delivery Reviews 42 (2000) 29–64, punkty: 2.1., 5.1., 5.3.